

**PENINGKATAN IMUNITAS BENIH IKAN KERAPU HIBRID CANTIK
DENGAN LIPOPOLISAKARIDA (LPS)**

***INCREASE OF IMMUNITY CANTIK HYBRID GROUPEL JUVENILES
BY LIPOPOLYSACCHARIDE (LPS)***

Des Roza

Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut dan Penyuluhan Perikanan
BD Gondol, Desa Penyabangan, Kec. Gerokgak, Kab. Buleleng, Bali
E-mail : desrozaboer14@gmail.com

ABSTRACT

*Disease is one of obstacle in fish culture. Immunity of fish against disease can be increased by using immunostimulant. The purpose of this experiment to increasing immunity of cantik hybrid grouper (cross breeding of tiger grouper, *Epinephelus fuscoguttatus* female with marbled grouper, *E. polyphekadion* male) to the diseases by using immunostimulant. Treatments were LPS cell walls of *V. alginolyticus* and commercial LPS was also used in this study, as a-control without LPS was used saline water (0.85% NaCl). The LPS was delivered by injection intra-muscularly with concentration of 0.1 mL/fish. This experiment was design by completely randomized with 3 replicates. Results showed that LPS were effective to increase titer antibody values and survival rates of cantik hybrid grouper. The titer antibody values of fish after 90 days rearing period were 128 (LPS from *V. alginolyticus*), 64 (commercial LPS), and only 4 in the control fish. The survival rates at the end of experiment were $88.67 \pm 3.62\%$ (LPS from *V. alginolyticus*), $85.22 \pm 5.93\%$ (commercial LPS), and only $50.13 \pm 6.11\%$ in the control fish. Relative percentage survival of fish following challenged with live *V. alginolyticus* were 77.46% in the received LPS from *V. alginolyticus* cell wall and 71.12% in the fish received commercial LPS. It is suggested that LPS effective to increase immunity of cantik hybrid grouper against bacterial infection.*

Keywords: cantik hybrid grouper, immunity, lipopolysaccharide, *Vibrio alginolyticus*

ABSTRAK

Penyakit merupakan salah satu kendala dalam budidaya perikanan. Imunitas ikan terhadap serangan penyakit dapat ditingkatkan antara lain dengan pemberian imunostimulan. Tujuan penelitian ini untuk meningkatkan imunitas benih ikan kerapu hibrid cantik (perkawinan silang antara kerapu macan, *Epinephelus fuscoguttatus* betina dengan kerapu batik, *E. polyphekadion* jantan) terhadap penyakit melalui pemberian imunostimulan. LPS yang digunakan dalam penelitian ini adalah LPS dari dinding sel *Vibrio alginolyticus* dan LPS komersial, sedangkan kontrol hanya menggunakan larutan fisiologis 0,85% NaCl (tanpa LPS). LPS diaplikasikan melalui penyuntikan intra-muskuler dengan dosis 0,1 mL/ekor ikan. Penelitian menggunakan rancangan acak lengkap dengan tiga ulangan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa LPS yang diberikan efektif meningkatkan nilai titer antibodi dan sintasan benih kerapu hibrid cantik. Nilai titer antibodi pada masing-masing perlakuan di akhir penelitian adalah 128 (LPS dari *V. alginolyticus*), 64 (LPS komersial) dan 4 pada kontrol. Sintasan ikan sampai akhir penelitian adalah $88,67 \pm 3,62\%$ (LPS dari *V. alginolyticus*), $85,22 \pm 5,93\%$ (LPS komersial) dan hanya $50,13 \pm 6,11\%$ pada kontrol. Nilai relative percentage survival setelah uji tantang adalah 77,46% pada ikan yang disuntik dengan LPS dari *V. alginolyticus* dan 71,12% pada ikan yang disuntik dengan LPS komersial. LPS efektif meningkatkan imunitas benih kerapu hibrid cantik terhadap infeksi bakteri.

Kata Kunci: kerapu hibrid cantik, imunitas, lipopolisakarida, *Vibrio alginolyticus*

I. PENDAHULUAN

Kerapu Hibrid Cantik merupakan hasil perkawinan silang antara kerapu macan, *Epinephelus fuscoguttatus* betina dengan kerapu batik, *E. polyphemus* jantan. Pada proses hibridisasi ini dilakukan penyilangan antara telur kerapu macan dengan sperma kerapu batik (James *et al.*, 1999). Hibridisasi bertujuan untuk mendapatkan strain kerapu baru yang lebih unggul dari induknya, misalnya harganya tinggi, tumbuh cepat, tahan terhadap perubahan lingkungan dan resisten terhadap penyakit (Kusumawati dan Ismi, 2013; Yudha dan Sutarmat, 2014).



Gambar 1. Ikan kerapu hibrid cantik.

Hasil pengamatan di lapangan menunjukkan bahwa sering terjadi kematian ikan budidaya yang disebabkan oleh berbagai jenis bakteri patogen, namun sampai saat ini belum tersedia informasi yang memadai tentang jenis, patogenisitas dan potensi masing-masing bakteri tersebut untuk digunakan sebagai imunostimulan. Mengingat perairan Indonesia sangat kaya akan keanekaragaman mikroba atau bakteri maka potensi bakteri-bakteri tersebut untuk digunakan sebagai kandidat imunostimulan perlu dipelajari. Penggunaan imunostimulan dan vaksinasi merupakan salah satu faktor pendukung keberhasilan budidaya perikanan melalui peningkatan daya kebal ikan.

Perkembangan usaha budidaya ikan kerapu selalu diikuti oleh berjangkitnya ber-

bagai jenis penyakit, baik yang disebabkan oleh infeksi virus, bakteri, parasit maupun penyakit non-infeksi seperti malnutrisi dan deformiti. Dari kelompok bakteri yang umum patogen terutama dari genus *Vibrio*, *Flexibacter* dan *Streptococcus* (Toranzo *et al.*, 2005; Zafran *et al.*, 2008; Austin, 2010). Banyak keluhan pembudidaya ikan yang mengalami ekor buntung akibat serangan bakteri *Flexibacter*, demikian pula halnya dengan *Vibrio* dan *Streptococcus*. Pengembangan vaksin untuk kelompok patogen ini juga perlu dilakukan. Di BBPPBL Gondol baru satu jenis vaksin *Vibrio polivalen* yang telah dikembangkan (Zafran *et al.*, 2010; Zafran *et al.*, 2011) dan saat ini dalam proses paten.

Salah satu upaya pencegahan infeksi penyakit di hatchery juga dapat dilakukan dengan meningkatkan respon imun non-spesifik ikan melalui pemberian imunostimulan (Rukyani *et al.*, 1998; Alifuddin, 2002; Roza *et al.*, 2004). Imunostimulan merupakan sekelompok senyawa biologi dan sintesis yang dapat meningkatkan sistem imunitas spesifik maupun non-spesifik. Mekanisme kerja imunostimulan yaitu dengan cara meningkatkan aktivitas oksidatif netrofil (Nayak., 2010; Johnny *et al.*, 2005). Aplikasi imunostimulan sudah banyak diterapkan pada beberapa jenis ikan baik melalui perendaman, suntikan maupun secara oral melalui pakan (Thompson *et al.*, 1999; Johnny *et al.*, 2010; Roza *et al.*, 2012).

Percobaan skala laboratorium penggunaan imunostimulan pada ikan kerapu telah dilakukan di BBPPBL Gondol, diantaranya penggunaan imunostimulan peptidoglikan dalam pakan pelet (Johnny *et al.*, 2001; Johnny *et al.*, 2009), dengan perendaman (Crosbie and Nowak, 2004; Roza *et al.*, 2004; Roza *et al.*, 2006), penyuntikan peptidoglycan secara intraperitoneal pada ikan kerapu macan, *Epinephelus fuscoguttatus* (Johnny dan Roza, 2002; Roza *et al.*, 2010). Tetapi, aplikasi imunostimulan skala massal di hatchery belum banyak dilakukan. Imunostimulan dapat diperoleh dari berbagai

sumber antara lain dari dinding sel bakteri (Rukyani *et al.*, 1998; Kamiso *et al.*, 2005), dinding sel ragi (Zhu *et al.*, 2006), cangkang udang dan krustasea (Kumar *et al.*, 2008) dan miselia jamur (Almendras, 2001).

Perusakan dinding sel bakteri bertujuan untuk memperoleh LPS yang murni dan bebas dari ikatan-ikatan biokimia sel bakteri, sehingga bahan aktif LPS dari sel bakteri yang diperoleh tidak diikuti oleh bahan penghambat aktivasi LPS. LPS adalah komponen utama lapisan luar dari bakteri, penyambung utama dari integritas struktur dari bakteri dan melindungi membran dari berbagai jenis kerusakan oleh bahan kimia. Selain itu, LPS merupakan suatu endotoksin yang memicu suatu respon yang kuat dari sistem kebal hewan normal. LPS berperan sebagai prototipikal endotoksin karena LPS akan berikatan ke reseptor dari sel makrofag. LPS terdiri dari lipid A, polisakarida inti, dan rantai polisakarida spesifik-O. Lipid A adalah glikolipid yang terdiri dari disakarida glukosamin yang tersubstitusi ikatan beta (1,6)-nya. Lipid A bertanggungjawab terhadap efek beracun dengan cara menstimulasi pembentukan dan juga pada sekresi sitokina yang menimbulkan gejala keracunan. Stimulasi tersebut terjadi karena Lipid A bersama dengan protein pengikat LPS/ LPS binding protein (LBP) berikatan ke reseptor CD14 dari sel makrofag. IL-10 dan faktor nekrosis tumor (TNF) akan menginduksi pada peningkatan sintesis prostaglandin E2 di hipotalamus. Polisakarida inti adalah polisakarida kompleks yang biasanya terhubung dengan lipid A melalui ikatan 3-deoksi-D-manno-octulosonat. Rantai spesifik O terdiri dari rantai subunit oligosakarida identik (linear atau bercabang) dengan panjang yang bervariasi. Jumlah subunit dapat bervariasi bahkan pada sel yang sama, yang jumlah subunitnya antara 3, 4 atau 5. Rantai spesifik O menentukan spesifisitas antigen O dari serotipe tertentu.

LPS dapat meningkatkan *negative charge cell membrane* dan membantu menstabilkan struktur membran secara ke-

seluruhan. Sebagai itu LPS adalah exogenous pyrogen atau senyawa yang menyebabkan demam eksternal. Dengan peran LPS yang begitu penting bagi bakteri, dapat mematikan sel jika dimutasi/dipindahkan atau dibuang, maka LPS selanjutnya merupakan target utama untuk senyawa antimikrobal dimasa depan (Ezzel *et al.*, 1990; Vadstein, 1997; Roza *et al.*, 2002).

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menguji efektivitas LPS dari dinding sel bakteri *Vibrio alginolyticus* sebagai kandidat imunostimulan dalam meningkatkan imunitas benih kerapu hibrid cantik, sehingga dengan demikian dapat meningkatkan produksinya terutama di *hatchery*.

II. METODOLOGI

2.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Pelaksanaan penelitian, mulai bulan Agustus sampai Desember 2015 selama 90 hari. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Patologi, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Budidaya Laut (BBPPBL) Gondol, Desa Penyabangan, Kecamatan Gerokgak, Kabupaten Buleleng, Bali.

2.2. Uji Patogenisitas

Berdasarkan hasil karakterisasi terhadap bakteri patogen pada budidaya ikan kerapu telah diketahui 3 spesies bakteri yaitu *Vibrio harveyi*, *V. alginolyticus* dan *Photobacterium leiognathi*. Terhadap ketiga spesies bakteri patogen tersebut dilakukan uji tingkat patogenisitasnya dan spesies bakteri yang diketahui paling patogen untuk digunakan pada uji selanjutnya sebagai kandidat untuk imunostimulan. Masing-masing isolat bakteri, diinjeksikan secara intramuskuler dengan dosis 0,1 mL/ekor pada benih kerapu hibrid ukuran 6-8 cm (panjang total). Penelitian mempergunakan benih kerapu hibrid cantik sebanyak 25 ekor, ikan dipelihara dalam bak fiber volume 250 L berisikan air laut sebanyak 200 L dan diaerasi. Pakan yang diberikan adalah pakan pelet Otohime (Jepang) dengan kadar protein 48% setiap

pagi dan sore hari (ad libitum), dan penyifonan dilakukan setiap pagi sebesar 50%. Pengamatan dilakukan selama lima belas hari dengan melihat gejala kilinis dan sintasan sampai akhir pengamatan.

2.3. Pemisahan Lipopolisakarida *Vibrio alginolyticus*

Bakteri ditumbuhkan pada media penumbuh TSA (*Tryptic Soy Agar*) dan dipanen dalam *saline* steril dengan kepadatan 10^{10} CFU/mL. Suspensi disentrifusa dengan kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit dengan suhu 4°C. Buang supernatan, tambahkan 0,1 g/mL dalam 0,1 M *acetate buffer* (1,25 mM MgOSO₄, pH 5,0) dengan perbandingan 1:1. Suspensi diaduk rata dengan vortex, tambahkan 1 µg DNase dan RNase per mL. Dinginkan suspensi dalam *freezer* suhu -10°C selama 10 menit, perusakan dinding sel bakteri dilakukan dengan menggunakan larutan phenol chloroform absolut dalam kondisi hangat pada suhu 56-60°C dengan konsentrasi 1-2 kali suspensi dan didiamkan beberapa menit. Suspensi yang mengandung sel bakteri yang telah rusak disentrifusa dengan kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit dengan suhu 4°C, buang supernatan. Lakukan pencucian pelet sebanyak 3x dalam larutan dingin HEPES (10 mM N-2-hydroethylpiperazine-N'-2-ethanesulphonic acid) yang mengandung 0,1 M NaCl. Pemeriksaan mikroskopis dilakukan dengan pewarnaan *crystal violet* untuk memastikan tidak ada lagi sel yang utuh. Tambahkan 0,05 g/mL PBS (10 mM sodium phosphate dalam 0,85% NaCl, pH 7,3). Suspensi diaduk rata dan disterilkan dengan autoclave selama 15 menit. Lipopolisakarida telah diperoleh, dapat dikoleksi dan siap digunakan. Metode yang digunakan dalam percobaan adalah modifikasi metode Kamiso *et al.* (2005).

2.4. Uji Aplikasi Lipopolisakarida

Penelitian aplikasi ini digunakan 2 jenis LPS yaitu : LPS dari dinding sel *V. alginolyticus* dan LPS komersial serta kontrol

(tanpa LPS). Terhadap masing-masing 300 ekor benih kerapu hibrid cantik dengan panjang total 8-10 cm disuntik secara IM (intramuskuler) dengan ke-2 jenis LPS uji dengan dosis 0,1 mL/ekor, sedangkan kontrol hanya disuntik dengan NaCl fisiologis dengan dosis 0,1 mL/ekor. Ikan kemudian dipelihara di bak beton volume 1 m³ yang dilengkapi dengan aerasi dan air mengalir dengan kepadatan 100 ekor/bak.

Pakan diberikan 2 kali sehari yaitu pelet Otohime (Jepang) dengan kadar protein 48% pada pagi dan sore (ad libitum), sedangkan penyifonan bak sebanyak 50% dan pembuangan kotoran dilakukan setiap hari. Booster dilakukan 15 hari pasca injeksi awal LPS. Ikan dipelihara selama 90 hari, pengambilan darah, pengukuran panjang dan bobot tubuh dilakukan pada awal serta 30 hari, 60 hari dan diakhir setelah 90 hari pasca injeksi LPS.

2.5. Uji Titer Antibodi

Uji titer antibodi dilakukan dalam wadah microwell dengan 96 sumur/lubang berpedoman pada Bricknell and Dalmo (2005) dan Kamiso *et al.* (2005). Serum darah ikan uji diencerkan secara bertingkat sebagai berikut: Ke dalam sumur pertama dan ke-2 dimasukkan masing-masing 50 µL serum darah ikan. Ke dalam sumur ke-2 selanjutnya ditambahkan 50 µL PBS dan diaduk merata. Dari sumur ke-2 diambil 50 µL dimasukkan ke dalam sumur ke-3 dan 50 µL PBS dan diaduk merata. Proses yang sama selanjutnya dilakukan pada sumur ke-4 dan seterusnya. Ke dalam masing-masing sumur selanjutnya dimasukkan 50 µL antigen bakteri.

Campuran serum darah dan antigen diaduk kemudian digoyang dengan rotator plate selama 1-3 menit dan didiamkan pada suhu kamar selama 4-6 jam. Kemudian di amati agluti-nasi atau penggumpalan antigen oleh serum dibawah mikroskop, pada tingkat pengencer-an tertinggi yang masih terjadi aglutinasi dinyatakan sebagai nilai titer antibodi dari ikan.

2.6. Uji Tantang

Uji tantang dilakukan setelah 90 hari pasca perlakuan imunostimulan, ke dalam sembilan bak polikarbonat volume 250 L dimasukkan masing-masing 20 ekor ikan dari masing-masing perlakuan LPS yaitu 3 bak untuk LPS dari dinding sel *V. alginolyticus*, 3 bak untuk LPS komersial dan 3 bak untuk kontrol. Uji tantang dilakukan dengan cara menyuntikkan 0,1 mL inokulum *V. Alginolyticus* dengan kepadatan 10^{10} CFU/mL. Selanjutnya ikan dipelihara selama 15 hari dan diberi pakan pelet Otohime (Jepang) pada pagi dan sore hari. Pembersihan dan penyifonan bak dilakukan setiap pagi dan selama uji tantang berlangsung hasil penyifonan ditampung dan diklorin selama 24 jam sebelum dibuang. Pengamatan dilakukan selama 15 hari terhadap gejala klinis dan sintasan. Data sintasan disajikan dalam bentuk *Relative Percentage Survival/RPS* (Amend, 1981) :

$$SR = \frac{N_t}{N_o} \times 100 \% \dots\dots\dots (1)$$

dimana: N_t = jumlah ikan yang hidup pada awal penelitian, N_o = jumlah ikan yang hidup pada akhir penelitian.

2.7. Analisis Data

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan 3 perlakuan dan 3 ulangan. Data dianalisis dengan Analisis Ragam (Anova) yang menggunakan *software* SPSS.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Setelah dilakukan uji patogenisitas ke-3 spesies bakteri patogen yaitu *V. harveyi*, *V. alginolyticus* dan *P. leiognathi* selama 15 hari pengamatan, terlihat *V. alginolyticus* lebih patogen terhadap benih kerapu hibrid cantik dibandingkan *V. harveyi* dan *P. leiognathi*. Mortalitas mulai terlihat setelah 4 hari pascainfeksi buatan. Mortalitas tertinggi

terjadi pada hari ke 7-8 pascainfeksi. Hasil lengkap disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Mortalitas (%) benih kerapu hibrid cantik yang diinfeksi dengan *Vibrio harveyi*, *V. alginolyticus* dan *Photobacterium leiognathi* selama 15 hari.

Spesies bakteri (10^5 CFU/mL)	Mortalitas (%)
<i>Vibrio harveyi</i>	21,33±8,33 ^b
<i>Vibrio alginolyticus</i>	50,67±8,33 ^a
<i>Photobacterium leiognathi</i>	9,33±10,07 ^c
Kontrol (tanpa bakteri)	2,67±4,62 ^c

Keterangan: Nilai dalam kolom yang diikuti oleh huruf superskrip yang sama tidak berbeda nyata ($<0,05$).

Tabel 1 terlihat bahwa benih kerapu hibrid cantik memberikan respon yang berbeda terhadap masing-masing agen patogen, terlihat ikan uji dalam penelitian ini lebih rentan terhadap *V. alginolyticus*. Kepadatan 10^5 CFU/mL sudah menyebabkan mortalitas sebesar 50,67%, *V. harveyi* hanya 21,33%, sedangkan *P. leiognathi* cenderung tidak membahayakan karena angka mortalitasnya sangat rendah (9,33%) dan hampir sama dengan kontrol yang hanya 2,67%.

Mortalitas yang disebabkan oleh Vibriosis mencapai 80% walaupun tidak semua spesies *Vibrio* bersifat patogen primer karena bakteri ini merupakan mikroflora yang normal hidup dilingkungan akuatik. Banyak dilaporkan bahwa *V. alginolyticus* bersifat patogen oportunist (Roza dan Johnny, 2008; Subasinghe, 2009) dimana pada kondisi tertentu bisa menjadi patogen (Johnny dan Roza, 2012). Penelitian membuktikan bahwa hanya beberapa spesies Vibriosis yaitu *V. anguillarum*, *V. ordalii* dan *V. salmonicida* yang bertindak sebagai patogen primer pada ikan laut, yaitu spesies yang virulensinya tinggi dapat menyebabkan

Vibriosis meskipun tanpa adanya faktor stres eksternal (Toranzo *et al.*, 2005).

Setelah diinfeksi dengan *V. alginolyticus*, *V. harveyi* dan *P. leiognathi* gejala klinis yang terlihat hampir sama dengan gejala klinis yang diinfeksi dengan *V. alginolyticus*. Badan ikan terlihat kemerahan, terjadi peradangan, nekrosis dan ulser, selain itu perilaku berenangannya mulai terganggu dengan berputar-putar atau diam, tidak mau makan dan produksi lendir meningkat. Melihat produksi lendir yang berlebihan ini mengindikasikan ikan dalam keadaan tidak baik (Roza *et al.*, 2010). Sementara itu, Toranzo *et al.* (2005) menyatakan Vibriosis menyebabkan gejala septicemia dengan luka menyebar pada kulit, terjadi nekrosis pada hati, ginjal dan jaringan yang lain. *V. alginolyticus* menyerang ikan dan organisme lainnya dimulai dari bagian lendir (mukus) yang diproduksi oleh tubuh karena lendir merupakan lapisan pertama pertahanan ikan.

Irianto (2005) mengatakan tanda klinis infeksi *Vibrio* adalah terjadi septicemia, hemoragik pada kulit, insang dan ekor serta borok pada kulit, hemoragik pada jaringan otot juga permukaan serosal. Limpa ikan yang terinfeksi mengalami pembengkakan dan berwarna merah cerah, secara histologis hati, ginjal, limpa dan mukosa usus mengalami nekrosis. Kemampuan menimbulkan Vibriosis dari isolat uji berhubungan dengan kecepatan bakteri mengakses organ atau jaringan target dan menghasilkan faktor virulensi (Kamiso *et al.*, 2005).

Pertumbuhan bakteri pada fase logaritmik (eksponensial) dipengaruhi oleh sifat genetik yang diwariskan, kandungan nutrisi

dalam media, suhu inkubasi dan kondisi pH. Jika pertumbuhan bakteri telah menghasilkan populasi yang maksimum, maka akan terjadi keseimbangan antara jumlah sel yang hidup dan yang mati. Fase stasioner terjadi saat laju pertumbuhan bakteri sama dengan laju kematiannya, sehingga jumlah keseluruhan bakteri akan tetap, keseimbangan jumlah bakteri terjadi karena pengurangan pembelahan sel akibat berkurangnya nutrisi media dan akumulasi produk toksik.

Fase stasioner ini dilanjutkan dengan fase kematian yang ditandai dengan peningkatan laju kematian yang melampaui laju pertumbuhan, sehingga secara keseluruhan menyebabkan terjadinya penurunan populasi bakteri. Dari pengamatan terhadap gejala klinis yang ditimbulkan masing-masing isolat bakteri ternyata tidak terlihat adanya perbedaan yang jelas, begitu juga pada pola pertumbuhannya. Berdasarkan hasil uji patogenisitas ini, maka untuk uji selanjutnya digunakan *V. alginolyticus* karena lebih patogen dibanding 2 spesies bakteri lainnya.

Setelah 90 hari perlakuan terlihat tidak ada perbedaan sintasan antara perlakuan LPS dari dinding sel *V. alginolyticus* dan LPS komersial, sedangkan dengan kontrol (tanpa LPS) sangat berbeda nyata ($P < 0,05$). Secara kasat mata, hal ini mulai terlihat setelah sebulan pasca perlakuan. Ikan pada bak kontrol mulai terlihat lemah, nafsu makan mulai menurun dan tidak banyak bergerak, permukaan tubuh terlihat memerah, adanya luka dan borok, tetapi ikan yang diberi perlakuan LPS masih terlihat bergerak aktif dengan nafsu makan yang tinggi. Data lengkap disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Sintasan (%) benih kerapu hibrid cantik yang diberi perlakuan LPS *V. alginolyticus* dan LPS komersial selama 90 hari.

Perlakuan	D-0	D-30	D-60	D-90
LPS <i>V.alginolyticus</i>	100 ± 0 ^a	97,67±2,80 ^a	95,33±1,53 ^a	89,33±3,62 ^a
LPS komersial	100 ± 0 ^a	96,33±4,04 ^a	94,00±1,73 ^a	86,13±5,93 ^a
Kontrol	100 ± 0 ^a	93,67±2,52 ^a	80,33±4,04 ^b	50,11±6,11 ^b

Keterangan: Nilai dalam kolom yang diikuti oleh huruf superskrip yang sama tidak berbeda nyata ($<0,05$).

Tabel 2 terlihat bahwa setelah 90 hari perlakuan LPS dari dinding sel *V. alginolyticus* maupun LPS komersial memberikan sintasan yang jauh lebih tinggi yakni masing-masing sebesar 89,33% dan 86,13% daripada kontrol (tanpa LPS) yang hanya 50,11%. Walaupun diantara perlakuan ke-2 jenis LPS tersebut tidak memperlihatkan perbedaan yang nyata. Memang terlihat ada penurunan persentase sintasan sejalan dengan bertambahnya umur ikan, tetapi disini terlihat bahwa secara langsung pemberian LPS dapat berperan sangat baik sebagai imunostimulan dan efektif untuk meningkatkan imunitas ikan. Hal ini juga ditemukan pada penelitian Zafran *et al.* (2008) dimana ikan kerapu yang diberi vaksin bakteri polivalen sintasannya jauh lebih tinggi dibanding ikan yang tidak divaksin.

Uji tantang dilakukan setelah 90 hari pasca perlakuan imunostimulan, dengan penyuntikan 0,1 mL inokulum *V. Alginolyticus* pada kepadatan 10^{10} CFU/mL. Setelah 15 hari pengamatan, hasilnya memperlihatkan bahwa ikan kerapu hybrid cantik yang diberi perlakuan imunostimulan, baik pada perlakuan LPS dari dinding sel *V. Alginolyticus* maupun pada LPS komersial mampu bertahan hidup walaupun diinfeksi dengan *V. alginolyticus* (Tabel 3). Tetapi pada kontrol setelah tiga hari pasca infeksi terlihat ikan mulai mengalami gangguan nafsu makan, gerakan mulai lamban dan sering muncul kepermukaan. Sedangkan gejala klinis lainnya pada permukaan tubuh dan ekor memerah, akhirnya timbul luka yang berujung

pada kematian. Gejala ini tidak terlihat pada ikan yang diberi perlakuan LPS dari dinding sel *V. alginolyticus* maupun LPS komersial, bahkan pada ikan yang mati sekalipun tidak terlihat adanya bercak merah dan luka pada tubuhnya. Nilai RPS perlakuan LPS dari dinding sel *V. alginolyticus* adalah 77,46% dan LPS komersial 71,12%. Dari nilai RPS tersebut dapat dipastikan bahwa pemberian LPS dari dinding sel *V. alginolyticus* dan LPS komersial efektif sehingga meningkatkan imunitas benih kerapu hybrid cantik di hatchery. Hal ini juga dibuktikan oleh Lin *et al.* (2006), vaksinasi ikan cobia dengan vaksin polivalen juga dapat meningkatkan imunitasnya baik di hatchery maupun di keramba jaring apung.

Berdasarkan data dari Tabel 4, diketahui bahwa nilai titer antibodi benih kerapu setelah 90 hari tertinggi pada perlakuan LPS dari dinding sel *V. alginolyticus* sebesar 128 kali pengenceran, diikuti LPS komersial yaitu sebesar 64 kali pengenceran dan terendah pada kontrol (tanpa LPS) hanya 4 kali pengenceran. Lipopolisakarida (*lipopolysaccharide*, *lipoglycan*, *LPS*) adalah sebuah molekul besar berupa kompleks antara senyawa lipid dan polisakarida dengan ikatan kovalen. Senyawa LPS banyak ditemukan pada lapisan membran sel sebelah luar bakteri gram negatif dan bersifat endotoksin, yang memicu aktivasi. LPS memainkan peran penting dalam fungsi bakteri. Molekul-molekul besar yang dapat terbentuk dari polisakarida dan lipid disebut LPS.

Tabel 3. Sintasan (%) benih kerapu hibrid cantik yang diberi perlakuan LPS *V. alginolyticus* dan LPS komersial setelah uji tantang dengan *V. alginolyticus* selama 15 hari.

Perlakuan	Sintasan (%)	Relative Percentage Survival (%)
LPS <i>Vibrio alginolyticus</i>	89,33±3,62 ^a	77,46
LPS komersial	86,13±5,93 ^a	71,12
Kontrol	50,11±6,11 ^b	-

Keterangan: Nilai dalam kolom yang diikuti oleh huruf superskrip yang sama tidak berbeda nyata (<0,05).

Tabel 4. Nilai titer antibodi benih kerapu hibrid cantik yang diberi perlakuan LPS dari dinding sel *V. alginolyticus* dan LPS komersial setelah 90 hari.

Perlakuan	Uji titer	Hari ke-30	Hari ke-60	Hari ke-90
LPS <i>V. alginolyticus</i>	<i>V. alginolyticus</i>	1/16	1/32	1/128
LPS komersial	<i>V. alginolyticus</i>	1/16	1/32	1/64
Kontrol/Control	<i>V. alginolyticus</i>	1/2	1/4	1/4

Endotoksin bakteri adalah molekul LPS, yang merupakan komponen dinding sel bakteri Gram-negatif, yang dapat menimbulkan respon pirogenik (demam). Endotoksin adalah toksin pada bakteri Gram-negatif berupa LPS pada membran luar dari dinding sel yang pada keadaan tertentu bersifat toksik pada inang tertentu. LPS ini disebut endotoksin karena terikat pada bakteri dan dilepaskan saat mikroorganisme mengalami lisis atau pecahnya sel (Han, 2000; Johnny *et al.*, 2010). Beberapa juga dilepaskan saat replikasi bakteri. Komponen toksik pada LPS adalah bagian lipid atau lemak, yang disebut lipid A. Komponen lipid A ini bukanlah struktur makromolekuler tunggal melainkan terdiri dari susunan kompleks dari residu-residu lipid.

Endotoksin hanya ada pada bakteri Gram-negatif berbentuk basil/batang dan kokus dan tidak secara aktif dilepaskan dari sel serta dapat menimbulkan demam, syok, dan gejala lainnya. Deteksi dan eliminasi endotoksin telah menjadi masalah bertahun-tahun bagi industri farmasi. Contohnya pemberian obat yang terkontaminasi dengan endotoksin dapat berakibat pada komplikasi bahkan kematian kepada pasien. Prosedur tersebut harus sangat sensitif sehingga dapat mendeteksi endotoksin sampai dengan 0,25 endotoksin unit (EU) atau setara dengan 0,025 ng/mL.

Deteksi endotoksin dapat dilakukan dengan menggunakan LAL (*Limulus Amoebocyte Lysate*) test. Prosedur ini akurat dan lebih praktis dibanding metode kuno sebelumnya yaitu menggunakan kelinci. LAL test didasarkan pada observasi pembentukan gel beku sewaktu endotoksin bersentuhan dengan protein pembeku dari amoebocytes

limulus yang bersikulasi. Perangkat uji ini terdiri dari kalsium, enzim propembekuan (proclotting) dan senyawa propenggumpalan/prokoagulan (procoagulan).

Enzim proclotting akan teraktivasi oleh endotoksin dan kalsium untuk membentuk enzim pembeku (*clotting enzyme*) yang akan memotong prokoagulan menjadi subunit polipeptida (koagulogen). Sub unit-sub unit tersebut akan bergabung membentuk ikatan disulfida membentuk gel beku. Jika diperlukan, bisa dilakukan metode spektrofotometri untuk mengukur jumlah protein yang tergumpalkan pada lisat tersebut yang mana bisa terdeteksi hingga 10 pg/mL LPS.

Mekanisme kerja imunostimulan dalam merangsang tanggap kebal menurut Crosbie and Nowak (2014), imunostimulan merangsang makrofag untuk memproduksi interleukin dan membuat makrofag menjadi aktif (makrofag teraktivasi). Interleukin kemudian merangsang pematangan sel limfosit sehingga berdiferensiasi menjadi sel B dan sel T. Selanjutnya sel T akan memproduksi limfokinin yang akan menjaga makrofag tetap aktif sehingga memfagositosis benda asing lebih banyak, sedangkan sel B akan berdiferensiasi menjadi sel memori dan sel plasma yang akhirnya memproduksi antibodi (kekebalan spesifik). Aktivitas makrofag yang berkesinambungan inilah yang menyebabkan peningkatan tanggap kebal non-spesifik.

Menggertak kembali proses tanggap kebal dilakukan booster atau pengulangan pemberian bahan imunostimulan ketika kadar imunitas ikan menurun. Hal ini bertujuan untuk meningkatkan kembali produksi antibodi. Menurut Bagni *et al.* (2000) dengan booster ulang dapat meningkatkan kembali

fungsi leukosit, pertahanan melawan penyakit infeksius dan tidak menyebabkan ikan stres.

Pengendalian penyakit harus dilakukan sedini mungkin, agar tidak terjadi wabah penyakit yang menyebabkan kerugian pada ekonomi. Upaya pengendalian yang dapat dilakukan dengan pemakaian bahan kimia, namun pemakaiannya untuk jangka panjang dapat menimbulkan dampak negatif. Dampak ini bukan saja terhadap lingkungan perairan dan patogen yang menjadi resisten, bahkan terhadap kesehatan konsumen karena residu antibiotik yang bersifat karsinogenik. Imunostimulan merupakan alternatif aman, efektif dan ekonomis dalam mencegah terjadinya wabah penyakit sehingga produksi dapat ditingkatkan.

Kegiatan budidaya ikan, metode yang sering digunakan untuk menangani infeksi patogen adalah penggunaan antibiotik dan kemoterapeutik secara terbatas. Namun, selain memiliki efektivitas rendah dan mahal, penggunaan bahan-bahan kimia dapat menyebabkan akumulasi di lingkungan maupun dalam tubuh ikan yang secara potensial dapat mengancam kesehatan konsumen serta lingkungan (Evelyn, 2002). Aplikasi imunostimulan LPS berkorelasi positif terhadap perbaikan lingkungan disatu sisi dan peningkatan keuntungan pembudidaya disisi lain sebagai efek turunya kejadian penyakit.

IV. KESIMPULAN

Imunostimulan LPS dari dinding sel *Vibrio alginolyticus* dan LPS komersial dengan metode penyuntikan secara intramuskuler efektif untuk meningkatkan imunitas benih kerapu hibrid cantik terhadap infeksi bakteri. Nilai titer antibodi dan RPS tertinggi terlihat pada perlakuan LPS dari dinding sel *V. alginolyticus* sebesar 128 kali pengenceran dan RPS 77,46%. Pada perlakuan LPS komersial nilai titer antibodi 64 kali dan RPS 71,12%. Sedangkan kontrol hanya 4 kali. Hasil penelitian ini dapat diaplikasikan pada pemeliharaan kerapu di *hatchery*, sehingga

dapat meningkatkan produksi benih yang berkualitas baik.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai dari DIPA T.A. 2015 Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Budidaya Laut, Gondol, Bali. Terima kasih kepada Fris Johnny (Alm) sebagai penanggung jawab penelitian ini serta Zafran, Slamet Haryanto, Mohamad Ansari, Sri Suratmi dan Kristiana Subyakto yang telah membantu terlaksananya penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Alifudin, M. 2002. Imunostimulan pada hewan akuatik. *Akuakultur Indonesia*, 41(2): 87-92.
- Almendras, J.M.E. 2001. Immunity and biological methods of disease prevention and control. In Lio-Po, G.D., C.R. Lavilla, and E.R. Cruz-Lacierda (eds.). *Health Management in Aquaculture*. Tigbauan, Iloilo, Phillippines. SEA-FDEC Aquaculture Department. 137-158pp.
- Amend, D.F. 1981. Potency testing of fish vaccines. *Dev. Biol. Stand.*, 49:447-454.
- Austin, B. 2010. *Vibriosis as causal agents of zoonoses*. *Vet. Microbiol.*, 140:310-317.
- Bagni, M., L. Archetti, M. Amadori, and G. Marino. 2000. Effect of long-term oral administration of an immune-stimulant diet on innate immunity in seabass (*Dicentrarchus labrax*). *J. Vet. Med.*, 47:745-751.
- Bricknell, I. and R.A. Dalmo. 2005. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. *Fish and Shellfish Immunology*, 19(5):457-472.
- Crosbie, P.B. and B.F. Nowak. 2004. Immune responses of barramundi, *Lates calcarifer* (Bloch), after administration of an experimental *Vibrio harveyi* bacterin by intra-

- peritoneal injection, anal intubation and immersion. *J. Fish Diseases*, 27:623-632.
- Evelyn, T.P.T. 2002. Finfish immunology and its use in preventing infectious diseases in cultured finfish. In *Diseases in Asian Aquaculture IV*. C.R. Lavilla-Pitogo and E.R. Cruz-Lacierda (eds.). Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila. 303-324 pp.
- Ezzel, J.W., T.G. Abshire, S.F. Little, B.C. Lidgerding, and C. Brown. 1990. Identification of *Bacillus anthracis* by using monoclonal antibody to cell wall Galactose-N-Acetylglucosamine-Polysaccharide. *J. Clinical Microbiology*, 28(2):223-231.
- Han. 2000. The role of immunostimulants in monogastric animal and fish-review. *J. Anim. Sci.*, 13(8):1178-1187.
- Irianto, A. 2005. Patologi ikan teleostei. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. 256hlm.
- James, C.M., S.A. Al-Thobaiti, B.M. Rasem, and M.H. Carlos. 1999. Potential of grouper Hybrid (*Epinephelus fuscoguttatus* x *Epinephelus polyphekadion*) for aquaculture. *Aquacult. Eur. Mag.*, 24:35-37.
- Johnny, F., I. Koesharyani, D. Roza, Tridjoko, N.A. Giri, dan K. Suwiryana. 2001. Respon ikan kerapu bebek, *Cromileptes altivelis* terhadap imunostimulan peptidoglycan melalui pakan pelet. *J. Penelitian Perikanan Indonesia*, 7(4): 52-56.
- Johnny, F. dan D. Roza. 2002. Pengaruh penyuntikan imunostimulan peptidoglikan terhadap peningkatan tanggap kebal non-spesifik ikan kerapu macan, *Epinephelus fuscoguttatus*. Laporan Penelitian Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut, Gondol. 12hlm.
- Johnny, F., D. Roza, Zafran dan A. Prijono. 2005. Penggunaan imunostimulan untuk meningkatkan kekebalan non-spesifik benih ikan kerapu lumpur, *Epinephelus coioides* terhadap virus irido. *J. Penelitian Perikanan Indonesia*, 11(5):75-83.
- Johnny, F., Zafran dan D. Roza. 2009. Aplikasi vaksin anti bakteri polivalen pada budidaya ikan kerapu pasir, *Epinephelus corallicola* di keramba jaring apung. Prosiding Forum Inovasi Teknologi Akuakultur 2009. Hlm.:967-971.
- Johnny, F., D. Roza dan I. Mastuti. 2010. Aplikasi imunostimulan untuk meningkatkan imunitas non-spesifik ikan kerapu macan, *Epinephelus fuscoguttatus* terhadap penyakit infeksi di hatchery. Prosiding Forum Inovasi Teknologi Akuakultur 2010. Hlm.: 945-949.
- Johnny, F. dan D. Roza. 2012. Penyakit Infeksi Vibriosis pada Calon Induk Ikan Kerapu Sunu, *Plectropomus leopardus* di Hatchery. Dalam: Samingan et al. (eds.). Prosiding Seminar Nasional XXI Perhimpunan Biologi Indonesia. Univ. Syiah Kuala Banda Aceh. Hlm.:185-187.
- Kamiso, H.N., A. Isnansetyo, Triyanto, M. Murdjani, dan Murwantoko. 2005. Produksi vaksin *Vibrio* untuk mengatasi penyakit ikan kerapu. Seminar Riset Unggulan Strategis Nasional (RUSNAS) Kerapu. Jakarta. 16hlm.
- Kumar, S.R., V.P.I. Ahmed, V. Parameswaran, R. Sudhakaran, V.S. Babu, S.A.S. Hameed. 2008. Potential use of chitosan nanoparticles for oral delivery of DNA vaccine in Asian sea bass (*Lates calcarifer*) to protect from *Vibrio (Listonella) anguillarum*. *Fish and Shellfish Immuno.*, 25:47-56.
- Kusumawati, D. dan S. Ismi. 2013. Karakter fenotip dan genotip kerapu hybrid cantik (*Epinephelus fuscoguttatus* x *Epinephelus polyphekadion*) dengan populasi asal. Prosiding Forum Inovasi Teknologi Akuakultur 2014. Hlm.:729-740.

- Lin, J.H.T., T.Y. Chen, M.S. Chen, H.E. Chen, R.L. Chou, T.I. Chen, M.S. Shu, and H.E. Yang. 2006. Vaccination with three inactivated pathogens of cobia (*Rachicentron canadum*) stimulates protective immunity. *Aquaculture*, 255:125-132.
- Nayak, S.K. 2010. Probiotic and immunity: a fish perspective. *Fish and Shellfish Immunol.*, 29:2-14.
- Roza, D., F. Johnny, dan Tridjoko. 2004. Peningkatan imunitas yuwana ikan kerapu bebek, *Cromileptes altivelis* terhadap infeksi viral nervous necrosis (VNN). *J. Penelitian Perikanan Indonesia*, 10(1):61-70.
- Roza, D., F. Johnny, dan Tridjoko. 2006. Peningkatan respon imun non-spesifik benih kerapu bebek, *Cromileptes altivelis* dengan imunostimulan dan bakterin terhadap infeksi Viral Nervous Necrosis (VNN). *J. Penelitian Perikanan Indonesia*, 8(1):25-35.
- Roza, D. dan F. Johnny. 2008. Aplikasi bakterin sebagai imunostimulan untuk pencegahan infeksi viral nervous necrosis (VNN) pada benih ikan kerapu bebek, *Cromileptes altivelis*. *J. Perikanan UGM*, 5(2):139-148.
- Roza, D., F. Johnny, dan Zafran. 2010. Pengembangan vaksin bakteri untuk meningkatkan imunitas ikan kerapu macan, *Epinephelus fuscoguttatus* terhadap penyakit infeksi. Prosiding Forum Inovasi Teknologi Akuakultur 2010. Hlm.:939-944.
- Roza, D., F. Johnny, dan Zafran. 2012. Upaya meningkatkan titer antibodi benih ikan kerapu macan, *Epinephelus fuscoguttatus* di hatchery dengan menggunakan vaksin streptococcus. Laporan Teknis Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Budi daya Laut. Tahun 2012. 10hlm.
- Rukyani, A., F.H. Pasaribu, dan A. Sunarto. 1998. Penggunaan imunostimulan asal dinding sel bakteri untuk meningkatkan kekebalan udang windu. Dewan Riset Nasional. Laporan Riset Unggulan Terpadu. 64hlm.
- Subasinghe, R. 2009. Diseases control in aquaculture and responsible use of veterinary drugs and vaccine: the issues, prospects and challenges. In : Rogers, C. (eds.). The use of veterinary drugs and vaccines in Mediterranean aquaculture. Zaragoza Ci-heaam. 5-11pp.
- Taib, A.N.M., M.N. Shamsudin, and R. Rozita. 2002. Vibriosis vaccine development : *Vibrio alginolyticus*. In : Diseases in Asian Aquaculture IV. Lavilla-Pitogo, C.R. and E.R. Cruz-Lacierda (eds.). Fish Health Section, Asian Fisheries Society. Manila. 325-335pp.
- Thompson, K.D., J.H. Lilley, S.C. Chen, A. Adams, and R.H. Richards. 1999. The immune response of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) against *Aphanomyces invadans*. *Fish and Shellfish Immunology*, 9:195-210.
- Toranzo, A.E., B. Magarinos, and J.L. Romalde. 2005. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture*, 246:37-61.
- Vadstein, O. 1997. The use of immune-stimulation in marine larviculture: possibilities and challenges. *Aquaculture*, 155:401-417.
- Yudha, H.T. dan T. Sutarmat. 2014. Keragaan pertumbuhan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*), kerapu batik (*Epinephelus microdon*) dan kerapu hibrida cantik sebagai hasil persilangan kerapu macan dan kerapu batik. Prosiding FITA 2013. Hlm.: 617-623.
- Zafran, F. Johnny dan D. Roza. 2008. Peningkatan imunitas benih ikan kerapu pasir, *Epinephelus corallicola* melalui penggunaan vaksin bakteri polivalen. Prosiding Seminar Nasional Biodiversitas II. Universitas Airlangga Surabaya, 19 Juli 2008. Hlm.: 203-206.

- Zafran, D. Roza dan F. Johnny. 2010. Respon juvenil ikan kerapu bebek, *Cromileptes altivelis* terhadap vaksin *Vibrio* yang diberikan melalui perendaman. Prosiding Seminar Nasional Perikanan Indonesia 2010. Hlm.:305-308.
- Zafran, D. Roza, dan F. Johnny. 2011. Uji aplikasi vaksin bakteri vibrio polivalen pada larva ikan kerapu bebek, *Cromileptes altivelis* di hatchery. Dalam Isnansetyo *et al.* (eds.). Prosiding Seminar Nasional Tahunan VIII Hasil Penelitian Perikanan dan Kelautan Tahun 2011. Hlm.: 1-5.
- Zhu, K., Z. Chi, J. Li, F. Zhang, M. Li, H.N. Yasoda, and L. Wu. 2006. The surface display of haemolysin from *Vibrio harveyi* on yeast cells and their potential applications as live vaccine in marine fish. *Vaccine*, 24:6046-6052.
- Diterima* : 3 Oktober 2016
Direview : 3 November 2016
Disetujui : 20 Mei 2017